

## Sterol(s) fermentative transformation - using polyoxyethylated sterol cpds. as emulsifying agents

Patent Number : DE 3147843

International patents classification : C07J-005/00 C12P-033/00

• Abstract :

DE3147843 A Use of ethoxylated sterols as emulsifiers in fermentative transformations of sterols is new. Suitable microorganisms include strains of *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia* and *Streptomyces*. Particularly suitable are the mutant strains described in EP Application 79101036, namely CBS 437,77, ATCC 31456, ATCC 31457, ATCC 31459, ATCC 31460, DSM 1437, DSM 1439, DSM 1442, DSM 1443, DSM 1444 and DSM 1445.

Ethoxylated sterols exert an emulsifier action and at the same time enhance the metabolism of sterol-degrading microorganisms, so that sterol metabolic products (e.g. 1,4-pregnadien-3-one 20-carboxylic acid BNC) are produced in increased yields.

• Publication data :

Patent Family : DE3147843 A 19830707 DW1983-28 9p \*  
Priority n° : 1981DE-3147843 19811203  
Covered countries : 1  
Publications count : 1

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (HENK ) HENKEL KGAA  
Inventor(s) : KERSTEN J; KRBECHEK L; LEENDERS P;  
SCHINDLER J

• Accession codes :

Accession N° : 1983-706107 [28]  
Sec. Acc. n° CPI : C1983-064529

• Derwent codes :

Manual code : CPI: B01-B03 B01-D02  
B12-M09 D05-C04  
Derwent Classes : B01 D16

• Update codes :

Basic update code : 1983-28

BEST AVAILABLE COPY

**This Page Blank (uspto)**

(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift  
(11) DE 31 47 843 A 1

(51) Int. Cl. 3:  
**C07J 5/00**  
C 12 P 33/00

(21) Aktenzeichen: P 31 47 843.3  
(22) Anmeldetag: 3. 12. 81  
(23) Offenlegungstag: 7. 7. 83

Benördeneigentum

DE 31 47 843 A 1

(71) Anmelder:  
Henkel KGaA, 4000 Düsseldorf, DE

(72) Erfinder:  
Krbechek, Leroy, Dr., 55427 Golden Valley, Mn., US;  
Leenders, Peter, 55436 Edina, Mn., US; Kersten,  
Jerry, 55337 Burnsville, Mn., US; Schindler, Joachim,  
Dr., 4010 Hilden, DE

(54) »Mikrobielle Sterinfermentation«

Die Verwendung von ethoxylierten Sterinen als Emulgatoren in der mikrobiellen Sterinfermentation führt zu einer Erhöhung der Ausbeute an Stoffwechselprodukten. Insbesondere bei Einsatz einer Kombination von ethoxylierten Sterinen und anderen Emulgatoren metabolisieren die zum sterinabbaubefähigten Bakterien in erhöhtem Maße. (31 47 843)

DE 31 47 843 A 1

3147843

27.01.1982

NACHGERICHT

Patentanmeldung D 6434

- 8 -

HENKEL KGaA  
ZR-FE/Patente

P a t e n t a n s p r u c h

Verwendung von ethoxylierten Sterinen als Emulgatoren in  
der fermentativen Sterintransformation.

514/940  
47  
-d-  
Düsseldorf, 27.11.1981  
Henkelstraße 67

HENKEL KGaA  
ZR-FS/Patente  
Ba/Ne

P a t e n t a n m e l d u n g

D 6434

"Mikrobielle Sterinfermentation"

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Sterinfermentation, bei welchem ethoxylierte Sterine als Emulgatoren eingesetzt werden.

Es besteht ein wachsender Bedarf an Steroidzwischenstufen für die Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe. Dieser 10 Bedarf wird zunehmend aus fermentativ gewonnenen Abbau- produkten von Sterinen gedeckt. Dazu werden Sterine pflanzlichen oder tierischen Ursprungs in reiner oder stark angereicherter Form in wässriger Nährlösung eingesetzt. Durch Zusatz von Emulgatoren wird für eine 15 geeignete Verteilung der Sterine in dem wässrigen Nähr- medium gesorgt. Diese Emulgatoren dürfen das Wachstum der Microorganismen und den Sterinabbau nicht stören. In der DE-OS 29 36 125 ist ein Verfahren zum fermentativen Sterinabbau beschrieben, bei dem als Ausgangsmaterial 20 ein natürlich angereichertes Sterinkonzentrat dient. Als Emulgatoren werden Polyhydroxymethylmonolauryläther eingesetzt. Die Sterinkonzentrate werden zu 20-1,4-Pregnadien-3-on (BNC) abgebaut. In der älteren deutschen Patent- anmeldung P 31 13 035 ist ein Verfahren zur Herstellung 25 eines trizyklischen Steroidabbauproduktes unter Verwendung der Microorganismen-Defektmutante Chol 149-K 14 (DSM 2065) beschrieben. Als Emulgatoren wurden Fett-

säure-sorbitanester oder Ethylenoxidaddukte, Polyoxyethylen, Monolaurylätther oder Fettsäureamidoalkylbetain verwendet. In der Europäischen Patentanmeldung 79 101 036 ist ein Verfahren zur Herstellung von 3-Oxo-pregna-4-en-20-carbonsäure ( $\Delta$ -4 BNC) und/oder 3-Oxo-pregna-1,4-dien-20-carbonsäure ( $\Delta$ -1,4 BNC) aus Steroidsubstraten mit längeren Substituenten in C-17-Stellung auf fermentativem Wege beschrieben. Als Emulgatoren wurden Tween 80 (Polyoxyäthylensorbitanmonooleat) und BRI J 35 (Polyoxyethylenmonolaurylätther) verwendet.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß sterinabbauende Mikroorganismen in Gegenwart von ethoxylierten Sterinen als Emulgatoren in gesteigertem Maße metabolisieren und dabei in erhöhten Mengen Stoffwechselprodukte, wie z. B. BNC bilden. Ethoxylierte Sterine sind optimale Emulgatoren für den fermentativen Sterinabbau; sie führen zu einer beachtlichen Ausbeutesteigerung an Abbauprodukten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von ethoxylierten Sterinen als Emulgatoren in der mikrobiellen Sterintransformation. Es sind pflanzliche und tierische ethoxylierte Sterine mit verschiedenem Ethoxylierungsgrad geeignet. Die erfindungsgemäße mikrobielle Sterinfermentation erfolgt in grundsätzlich bekannter Weise. So kann beispielsweise die als Einsatzmaterial gewählte Steroidverbindung der Mikroorganismenkultur während der Inkubationsperiode zugesetzt werden, oder sie kann dem Nährmedium vor der Inokkulierung der Defektmutante beigegeben werden.

Es kann eine Steroidverbindung oder eine Mischung aus mehreren Steroidverbindungen eingesetzt werden.

Die optimale Konzentration an Steroidausgangsverbindung ist durch einfache Vorversuche zu ermitteln.

...

Sie liegt im allgemeinen im Bereich von 0,1 bis 100 g pro Liter Nährmedium. Es kann dabei vorteilhaft sein, das dem partiellen Abbau zu unterwerfende Substrat nicht auf einmal dem Reaktionsmedium zuzusetzen, sondern dieses portionsweise im Verlauf der Reaktion zuzugeben. Dabei kann die Zugabe im we sentlichen kontinuierlich erfolgen.

Die Mikroorganismenkultur wird in einem Nährmedium gezüchtet, das als Kohlenstoffquelle die zu transformierende Steroidverbindung und gegebenenfalls noch zusätzliche metabolisierbare Kohlenstoffquellen, sowie die üblicherweise von diesen Mikroorganismen benötigten Nähr- und Wuchsstoffe enthält. Geeignete Stickstoffquellen sind Ammoniumsalze, Nitrate, Maisquellwasser, Sojamehl, Schlempe oder Fischmehl. Auch Fermentationsbeschleuniger wie Hefeextrakt und Vitamine können zugesetzt werden. Das Nährmedium enthält darüber hinaus üblicherweise anorganische Salze wie Natrium-, Kalium- oder Ammonium-Phosphate oder Calcium-, Magnesium-, Mangan- und/oder Eisensalze. Die Emulgierung des Steroidausgangsmaterials erfolgt mit den ethoxylierten Sterinen. Besonders vorteilhaft ist es, ethoxylierte Sterine in Kombination mit anderen Emulgatoren einzusetzen. Dadurch wurde eine weitere Steigerung der Bildung von Steroidabbauprodukten festgestellt. Insbesondere in Kombination mit Kokosfettsäuremonoäthanolamid wurde ein deutlicher synergistischer Effekt, d. h. eine weitere Erhöhung der Produktivität der Mikroorganismen festgestellt. Geeignete Steroidausgangsmaterialien für die Transformation sind natürliche Sterine wie Cholesterin, Sito sterin, Stigmasterin und/oder Ergosterin oder Abkömmlinge hiervon.

Auch Gallensäuren, wie Cholsäure, Desoxycholsäure, Lithocholsäure und deren Gemische oder weitere Verbindungen mit der Steroidgrundstruktur, z. B. partielle Abbauprodukte von natürlichen Sterinen, sind geeignet. Als 5 Microorganismen, die zur Sterinfermentation befähigt sind, seien beispielhaft genannt:  
Achromobacter, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Flavobacterium, Microbacterium, Mycobacterium, Nocardia, Protaminobacter, Serratia und 10 Streptomyces.

Besonders geeignet für die Steroidtransformation zu BNC sind die in der Europäischen Patentanmeldung 79 101 036 beschriebenen Mutantenstämme, die aus bestimmt ausgewählten Wildstämmen mit anschließender Mutation und 15 Selektion gewonnen worden sind. Es sind dies die Stämme: CBS 437,77, ATCC 31 456, ATCC 31457, ATCC 31459, ATCC 31460, DSM 1437, DSM 1439, DSM 1442, DSM 1443, DSM 1444 und DSM 1445.  
Im einzelnen gelten dabei die Angaben in der genannten 20 europäischen Anmeldung.

#### Beispiel 1

Der Stamm T 191 (Corynebacterium spec.) DSM 1444 wurde in folgendem Nährmedium bei 30°C aerob angezüchtet: 0,30 % Glucose, 0,90 % Hefeextrakt, 0,80 % Pepton, 0,10 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,08 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0), 0,5 % Cholesterin und 25 0,3 % ethoxyliertes Sojasterin (Generol 122-Typen). In 4 Parallelansätzen wurde Sojasterin mit 5 Mol, 10 Mol, 16 Mol und 25 Mol Ethylenoxid geprüft. Nach einer Kulturdauer von 144 Stunden wurden Proben gezogen und die Aussicht 30 an BNC per Dünnschichtchromatographie bestimmt:

Emulgator	BNC-Ausbeute (g/l)			
	$\Delta_{-1,4}$	$\Delta_{-1,4,17}$	$\Delta_{-4}$	$\Sigma$
ohne	0,70	0,12	Spur	0,82
Generol 122-E 5	0,93	0,28	0,06	1,27
" " E 10	0,80	0,21	0,08	1,09
5 " " E 16	0,71	0,20	0,05	0,96
" " E 25	0,89	0,10	0,03	1,02

Beispiel 2

In einer weiteren Versuchsserie wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 1 die Wirkung von ethoxilierten Verbindungen in Kombination mit einem weiteren Emulgator geprüft. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Versuchsbedingungen: wie Beispiel 1

Emulgator	BNC-Ausbeute (g/l)			
	$\Delta_{-1,4}$	$\Delta_{-1,4,17}$	$\Delta_{-4}$	$\Sigma$
15 0,1 % Comperlan 100 <sup>+</sup>				
0,2 % Generol 122-E 5	1,08	0,33	0,07	1,38
0,1 % Comperlan 100				
0,2 % Generol 122-E 10	0,81	0,32	0,15	1,28
0,1 % Comperlan 100				
20 0,2 % Generol 122-E 16	1,33	0,35	0,17	1,85
0,1 % Comperlan 100				
0,2 % Generol 122-E 25	1,43	0,40	0,18	2,01

+ Comperlan: Kokosfettsäuremonoäthanolamid

Eine Steigerung der BMC-Bildung aus Sterinen durch ethoxylierte Generol 122-Typen konnte auch am Beispiel einer weiteren Bakterienart demonstriert werden.

### Beispiel 3

5 Der Stamm SC 372-837 (*Corynebacterium equi*) DSM 1990 wurde in folgendem Medium bei 30°C aerob angezüchtet:

0,25 % Glucose, 0,25 % Laktat, 0,80 % Hefeextrakt, 0,70 % Pepton, 0,10 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,08 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,50 % Cholesterin, 0,30 % ethoxylierte Sterine (pH 7,0).

10 Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

BMC (g/l)

Emulgator	△ -1,4	△-1,4,17	△- 4	Σ
ohne	1,98	0,24	0,16	2,38
Generol 122-E 5	3,49	0,36	0,12	3,97
15 Generol 122-E 10	3,28	-	-	3,28
Generol 122-E 16	3,50	0,29	0,13	3,92
Generol 122-E 25	3,46	0,39	0,10	3,95

### Beispiel 4

In einer weiteren Versuchsserie wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 3 die Wirkung der ethoxylierten Sterine in Kombination mit weiteren Emulgatoren geprüft. Es wurden dabei folgende Ergebnisse erhalten:

- 8 -

BNC (g/l)

Emulgator	Δ-1,4	Δ-1,4,17	Δ-4	Σ
0,1 % Comperlan 100				
0,2 % Generol 122-E 5	4,21	0,55	0,13	4,91
5 0,1 % Comperlan 100				
0,2 % Generol 122-E 10	3,35	0,46	0,31	4,12

Der Stamm SC 372-837 (*Corynebacterium equi*) DSM 1990 wurde unter den gleichen Kulturbedingungen wie in Beispiel 3 jedoch unter Verwendung von 0,3 % Generol 122 anstelle von Cholesterin als Substrat angezüchtet.  
10 Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Emulgator	BNC (g/l)
ohne	0,48
0,3 % Generol 122-E 10	0,77
15 0,3 % Generol 122-E 16	0,81
0,3 % Generol 122-E 25	0,73

**This Page Blank (uspto)**

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**  
**As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox**

This Page Blank (uspto)